

**DEPARTMENT OF BIOLOGICAL RESPONSES  
LABORATORY OF BIOLOGICAL PROTECTION**

Our laboratory has made two major achievements. First, we have found that fetal and adult hematopoietic stem cells have different developmental potential to differentiate into lymphocytes. Second, we have demonstrated that interleukin-7 (IL-7) controls DNA recombination of lymphocyte antigen receptor genes by changing chromatin structure. Both of them are related with fundamental questions in medicine and biology.

Based on these findings, we are now pursuing research on development and regulation of the immune system, focusing on the following questions: (1) molecular mechanism of lineage decision of immune cells from hematopoietic stem cells; (2) control mechanism of lymphocyte antigen receptor genes by chromatin structural changes; (3) regulation of immune response by controlling cytokine receptor expression.

**1) Regulation of TCR $\gamma$  Enhancer by STAT5: S. TANI-ICHI and K. IKUTA**

The IL-7 receptor (IL-7R) plays an essential role in  $\gamma\delta$  T cell development by inducing V-J recombination in the T cell antigen receptor (TCR)  $\gamma$  locus. Previously, we have shown that STAT5 activated by the IL-7R recruits transcriptional coactivators to J $\gamma$  promoter, and controls the accessibility of the TCR $\gamma$  locus by histone acetylation. Although STAT5 binds to and regulates J $\gamma$  region, germline transcription was impaired at the whole TCR $\gamma$  locus in IL-7-deficient mice. This result suggested that the IL-7R plays an essential role in the locus-wide control of the TCR $\gamma$  locus. To elucidate its mechanism, we first examined the changes of histone acetylation in pre-T cell line, SCID.adh with IL-7 stimulation. IL-7 induced histone acetylation at 3' enhancer (E $\gamma$ ), and constitutive-active STAT5 induced its histone acetylation. E $\gamma$  contains a STAT consensus motif highly conserved between human and mouse. STAT5 binding was detected by EMSA and ChIP assay in SCID.adh cells and RAG2<sup>-/-</sup> thymocytes after IL-7 stimulation. Previously, it was reported that Runx binds to E $\gamma$  and is essential for enhancer activity. We found that STAT5 augmented Runx-dependent enhancer activity of E $\gamma$  by reporter assay. These results suggest that IL-7/STAT5 signal may enhance germline transcription of TCR $\gamma$  genes by augmenting the E $\gamma$  activity.

**2) Accessibility Control of the V $\gamma$  Region by STAT5: S. TANI-ICHI and K. IKUTA**

Previously, we have shown that STAT5 binds to the J $\gamma$  promoter and controls chromatin accessibility by histone acetylation. However, little is known on the accessibility control of V $\gamma$  region. To elucidate the regulation by STAT5, we first analyzed the chromatin status of V $\gamma$  region in cytokine-dependent hematopoietic cell lines. The levels of histone H3 acetylation and germline

transcription are high at V $\gamma$ 5 and HsA and intermediate at V $\gamma$ 4 in IL-3-dependent Ba/F3 cells. We observed similar patterns of germline transcription in other cytokine-dependent hematopoietic cell lines. The histone acetylation and germline transcription in V $\gamma$  region are induced by cytokine signal and STAT5 in BaF3 cells. Importantly, we showed that the chromatin accessibility of V $\gamma$ 5 gene is increased by cytokine signal. Although STAT5 weakly binds to the motifs in both the V $\gamma$ 5 promoter and HsA in vitro, it is recruited only to the endogenous HsA chromatin by cytokine stimulation in vivo. In accordance with this result, STAT5 does not directly activate the V $\gamma$ 5 promoter by reporter assay. We further showed a bimodal pattern of histone acetylation at V $\gamma$ 5 and HsA, suggesting that the histone acetylation is discontinuous between the V $\gamma$ 5 promoter and HsA. Finally, we observed that V $\gamma$ 2 gene shows higher levels of histone acetylation and germline transcription than other V $\gamma$  genes in RAG-2 knockout thymocytes. Thus, this study implies a potential role of STAT5 in accessibility control of V $\gamma$  region.

### **3) MEK1/2 Induces Germline Transcription of the TCR $\gamma$ Locus by STAT5 Activation in IL-7 Receptor Signaling: K. MAKI and K. IKUTA**

Although the tyrosine residues in the intracellular domain of the mouse IL-7R  $\alpha$ -chain (IL-7R $\alpha$ ) have been implicated in STAT5 activation, it is still enigmatic whether the residues are essential for  $\gamma\delta$  T cell development. In this study, we showed that the tyrosine residues of IL-7R $\alpha$  are dispensable for  $\gamma\delta$  T cell development, because the mutant IL-7R $\alpha$  with four tyrosine residues replaced with phenylalanine in the intracellular domain (IL-7R-FFFF) partially rescued  $\gamma\delta$  T cell development from IL-7R $\alpha^{-/-}$  progenitors. To examine the signal pathway by IL-7R-FFFF, we introduced a chimeric receptor consisting of human IL-4R  $\alpha$ -chain and mouse IL-7R-FFFF (4R/7R-FFFF) into an IL-7-dependent pre-B cell line, preBR1. We found that 4R/7R-FFFF induced TCR $\gamma$  germline transcription and STAT5 activation. In addition, we found that the treatment with MEK1/2 inhibitor, U0126, significantly decreased the levels of TCR $\gamma$  germline transcription and STAT5 tyrosine phosphorylation by 4R/7R-FFFF, suggesting that MEK1/2 plays an alternative role in STAT5 activation by IL-7R. MEK1/2 associated with STAT5, and induced its tyrosine phosphorylation and DNA binding activity in HEK293T cells. Furthermore, MEK1 directly phosphorylated the tyrosine residue of STAT5 in vitro. Finally, active MEK1 partially rescued TCR $\gamma$  germline transcription by IL-7R in a pre-T cell line, Scid.adh. These results demonstrated that MEK1/2 induces TCR $\gamma$  germline transcription by phosphorylating STAT5 through IL-7R-FFFF. Thus, this study implies the potential role of MAPK in alternative activation of STAT5.

### **4) Transcriptional Activation of Mouse TCR J $\gamma$ 4 Germline Promoter by STAT5: N. MASUI, S. TANI-ICHI, K. MAKI and K. IKUTA**

Although a STAT motif is present in J $\gamma$ 4 germline promoter, it is still unknown whether STAT5 regulates the transcription of the J $\gamma$ 4 promoter. Here, we showed that cytokine stimulation induced J $\gamma$ 4-C $\gamma$ 4 germline transcripts in a pre-T cell line, Scid.adh, and a hematopoietic cell line, Ba/F3. A STAT consensus motif was present in 5' region of J $\gamma$ 4 gene segment. We found that STAT5 bound to the STAT motif of the J $\gamma$ 4 germline promoter in vitro by gel shift assay. In addition, we detected by chromatin immunoprecipitation assay that STAT5 was recruited to the endogenous J $\gamma$ 4 chromatin in Ba/F3 cells after cytokine stimulation. Finally, using reporter assay, we showed that the J $\gamma$ 4 germline promoter was activated by STAT5 and that mutation in the STAT motif abrogated the activity. Furthermore, this transactivation was augmented by transcriptional coactivators, CBP and p300. Collectively, these results demonstrate that STAT5 binds to the STAT motif in the J $\gamma$ 4 promoter and induces germline transcription. Thus, this study indicates that the IL-7R/STAT5 signal controls the transcription and accessibility of different clusters in the TCR $\gamma$  locus.

#### **5) Physical and Functional Interactions between STAT5 and Runx Transcription Factors: S. OGAWA and K. IKUTA**

The signal transducers and activators of transcription (STAT) and the Runt-related (Runx) are two of major transcription factor families that play essential roles in lymphocyte development. Although the interaction of Runx2 with STAT1 and STAT3 has been reported before, the interaction between STAT5 and Runx family proteins has not been characterized. In this study, we first showed that STAT5 physically interacts with Runx1, Runx2, and Runx3 by co-immunoprecipitation experiments. The Runt domain of Runx proteins and the DNA binding domain and  $\alpha$ -helix loop structure of STAT5 are responsible for the interaction. When expressed in CHO cells, STAT5 inhibits the nuclear localization of Runx proteins and retains them in the cytoplasm. In addition, we showed by reporter assay that the interaction between STAT5 and Runx proteins mutually inhibits their transcriptional activity. Furthermore, Runx proteins inhibit the DNA binding activity of STAT5. Finally, we found that Runx proteins suppress the transcription of an endogenous STAT5 target gene, cytokine-inducible SH2 protein-1, in an interleukin-3-dependent pro-B cell line, Ba/F3. These results collectively suggested that STAT5 and Runx proteins physically and functionally interact to mutually inhibit their transcriptional activity. Thus, this study implies a potential role of the STAT5-Runx interaction in lymphocyte development.

#### **6) Monoclonal Antibodies against a Novel Protein, U7, Expressed in Cancer Cells: M. UEDA**

Proteins from human bladder cell carcinoma and non-carcinoma tissue were analyzed by 2-D gel electrophoresis. We found a novel protein, tentatively named U7, which was highly expressed in bladder tumor cells. From the human genome database and proteome analysis, the U7 protein was

encoded by C7orf24 gene. No other human gene beyond 20% homology was found. By the PCR analysis, the U7 protein was detected in various tumor and embryonic cells as well as bladder tumor cells. To detect the U7 protein in tumor cells, monoclonal antibodies were established with GST-U7 fusion protein synthesized in *E. coli*. Six independent clones specifically reacted to the U7 protein, and three of them could be used in Western blot analysis.

## LIST OF PUBLICATIONS

### Department of Biological Responses

### Laboratory of Biological Protection

- Shibata, H., Tani-ichi, S., Lee, H.C., Maki, K., and Ikuta, K. (2007). Induction of the IL-7 receptor  $\alpha$  chain in mouse peripheral B cells by glucocorticoids. *Immunol. Lett.*, 111:45-50.
- Nakasone, C., Yamamoto, N., Nakamatsu, M., Kinjo, T., Miyagi, K., Uezu, K., Nakamura, K., Higa, F., Ishikawa, H., O'Brien, R.L., Ikuta, K., Kaku, M., Fujita, J., and Kawakami, K. (2007). Accumulation of gamma/delta T cells in the lungs and their roles in neutrophil-mediated host defense against pneumococcal infection. *Microbes Infect.*, 9:251-258.
- Zeng, B.X., Fujiwara, H., Sato, Y., Nishioka, Y., Yamada, S., Yoshioka, S., Ueda, M., Higuchi, T., and Fujii, S. (2007) Integrin  $\alpha 5$  is involved in fibronectin-induced human extravillous trophoblast invasion. *J. Reprod. Immunol.*, 73:1-10.
- Kageyama, S., Iwaki, H., Inoue, H., Isono, T., Yuasa, T., Nogawa, M., Maekawa, T., Ueda, M., Kajita, Y., Ogawa, O., Toguchida, J., and Yoshiki, T. (2007). A novel tumor-related protein, C7orf24, identified by proteome differential display of bladder urothelial carcinoma. *Proteomics Clin. Appl.*, 1:192-199.
- Maruyama, M., Hattori, A., Goto, Y., Ueda, M., Maeda, M., Fujiwara, H., and Tsujimoto, M. (2007). Laeverin/aminopeptidase Q, a novel bestatin-sensitive leucine aminopeptidase belonging to the M1 family of aminopeptidases. *J. Biol. Chem.*, 282:20088-20096.

---

Ikuta, K.: Control of the TCR $\gamma$  locus accessibility by Stat5 and histone modifications. The Japanese Society for Mucosal Immunology and the International Congress of Mucosal Immunology Joint Symposium. Tokyo, July 9, 2007.

Ikuta, K.: Control of the TCR $\gamma$  Locus Accessibility by Stat5 and Histone Modifications. The 14th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research. The Institute of Medical Science, the University of Tokyo, Tokyo, November 13, 2007.

瀬海美穂、喜納辰夫、生田宏一：転写因子 IRF によるストローマ細胞の IL-7 産生機構. 第 17 回 Kyoto T Cell Conference、京都、6 月 16 日、2007.

瀬海美穂、喜納辰夫、生田宏一：Production of IL-7 by lymphocyte-stromal cell crosstalk. 第 37 回日本免疫学会学術集会、東京、11 月 20 日、2007.

谷一靖江、生田宏一：Regulation of TCR $\gamma$  enhancer element by Stat5. 第 30 回日本分子生物学会年会／第 80 回日本生化学会大会 合同大会、横浜、12 月 14 日、2007.

瀬海美穂、喜納辰夫、生田宏一：リンパ球とストローマ細胞の相互作用による IL-7 の産生誘導機構.第 4 回京都大学ウイルス研究所学術交流会、京都、12 月 20 日、2007.

今年、2007年3月には長く研究室の運営に大きく貢献した技術補佐員の林聡子が退職し、大阪府立高校講師として新たな道を歩み始めた。4月には、谷一靖江が特任助手から助教へと昇任した。また、技術補佐員として岸田麻由が参加した。さらに、生命科学研究科修士課程大学院生として猪野友理子、角知代、戸田嗣人、中村弘毅、和田裕之が加わった。また、4月には理学部2回生の松澤朋寛が、5月には医学部4回生の矢内晶太が自主研究生として参加した。このような推移で、生体防御研究分野は現在、教授1名、講師1名、助教2名、大学院生9名、技術職員1名、技術補佐員1名、秘書1名の総勢16名となっている。このように、大学院生が増えたことで研究・教育のレベルがさらに増し、研究室の雰囲気がおおいに活性化した1年であり、今後も研究面で大きく発展することを期待している。

本分野では、造血幹細胞からの免疫系細胞の細胞系列決定と初期分化の分子機構、および免疫応答の制御機構を解明することを通じ、細胞分化の普遍的な原理を明らかにすることを目指している。特に、インターロイキン7 (IL-7) とそのレセプター (IL-7R) を切り口に、転写制御やクロマチン構造変換など、エピジェネティクスの観点から解析している。

#### (1) STAT5 による TCR $\gamma$ エンハンサー領域の制御

IL-7R シグナルは  $\gamma\delta$  T 細胞の分化に必須である。過去に我々の研究室では、IL-7R の下流で活性化される STAT5 が、TCR $\gamma$  鎖の J $\gamma$  遺伝子のプロモーターに結合し、ヒストンアセチル化酵素をリクルートしてくることで、J $\gamma$  遺伝子の germline 転写を誘導することを報告した。しかし、IL-7 欠損マウスでは、TCR $\gamma$  遺伝子座の全ての germline 転写が低下していることから、IL-7 シグナルは、J $\gamma$  のみならず、TCR $\gamma$  遺伝子座全体の制御に関わっている可能性が示唆される。そこで、pro-T 細胞株 SCID.adh を用いて、IL-7 刺激による TCR $\gamma$  遺伝子座の変化を調べたところ、エンハンサー領域 E $\gamma$  のヒストンアセチル化が上昇することが判明した。E $\gamma$  には、ヒトとマウスで高度に保存された STAT 結合モチーフが存在する。そこで、EMSA と ChIP を行った結果、IL-7 刺激によって STAT5 が E $\gamma$  に結合することが分かった。過去に、E $\gamma$  には Runx が結合しており、エンハンサー活性の誘導に必須であることが報告されている。そこで、STAT5 が E $\gamma$  領域に与える影響を検討するため、レポーター法を実施した。その結果、STAT5 は、Runx によって誘導される E $\gamma$  のエンハンサー活性を増強することが分かった。以上の結果から、IL-7-STAT5 シグナルは、E $\gamma$  のエンハンサー活性を高めることで、TCR $\gamma$  遺伝子全体の発現上昇／維持に働いていると考えられる。さらに、Runx が幹細胞の段階から発現しているのに対し、IL-7R はリンパ球に分化した細胞でのみ発現がみとめられることから、IL-7-STAT5 シグナルは、E $\gamma$  のエンハンサー活性を高めることで、 $\gamma\delta$  T 細胞への分化を支持する一つの要素であると考えられる。(谷一靖江、生田宏一)

## (2) STAT5によるV $\gamma$ 領域の制御

IL-7Rの下流で働く転写因子STAT5は、T細胞抗原受容体(TCR) $\gamma$ 遺伝子座のJ $\gamma$ 1プロモーターに結合し、ヒストンアセチル化とクロマチン構造変換を介して、J $\gamma$ 1遺伝子の転写と組換えを誘導する。しかし、TCR $\gamma$ 遺伝子座V領域の制御機構については不明である。マウスTCR $\gamma$ 遺伝子座の $\gamma$ 1クラスターでは、4つのV $\gamma$ 遺伝子(V $\gamma$ 5、V $\gamma$ 2、V $\gamma$ 4、V $\gamma$ 3)が、発生段階特異的に組換えをおこし、 $\gamma\delta$ T細胞の組織分布を決定する。胎児胸腺ではV $\gamma$ 3とV $\gamma$ 4が、成体胸腺ではV $\gamma$ 2が、成体小腸上皮ではV $\gamma$ 5が組換えをおこす。本研究では、成体で組換えを起こすV $\gamma$ 5遺伝子のクロマチン制御におけるSTAT5の役割を解析した。

造血前駆細胞株Ba/F3細胞をサイトカインで刺激すると、V $\gamma$ 領域の中でもV $\gamma$ 5遺伝子と調節領域HsAのみにヒストンアセチル化と転写が誘導された。活性型STAT5を導入したBa/F3細胞では、サイトカイン刺激非依存性にV $\gamma$ 5とHsAにヒストンアセチル化と転写が誘導された。さらに、STAT5は*in vitro*でV $\gamma$ 5プロモーターとHsAに結合する能力を示し、内在性HsAクロマチンへも結合した。一方、STAT5やHsA依存的なV $\gamma$ 5プロモーターの転写活性化は認められなかった。以上の結果から、STAT5はV $\gamma$ 領域の中でもV $\gamma$ 5とHsAのクロマチンを開く能力があることが示唆された。(谷一靖江、生田宏一)

## (3) IL-7RシグナルによるMEK1/2を介したTCR $\gamma$ 遺伝子座のV-J組換え制御

これまで我々はインターロイキン7受容体(IL-7R)が $\gamma\delta$ T細胞の分化に必須であり、下流シグナルにおいてSTAT5がTCR $\gamma$ 遺伝子座のV-J組換えを誘導することを明らかにした。一方、IL-7RシグナルはSTAT5のみならず、MAPキナーゼやPI3キナーゼなどの様々なシグナル伝達分子を活性化することが明らかになっているものの、それらの機能は未だ明らかになっていない。そこで我々は、STAT5の活性化に必須と考えられているIL-7R $\alpha$ 鎖細胞質内領域のチロシン残基をフェニールアラニンに置換した変異型IL-7R $\alpha$ 鎖(IL-7R $\alpha$ FFFF)を作製後、IL-7Rシグナルを解析した。まず、IL-7R $\alpha$ 鎖欠損マウスのT前駆細胞にIL-7R $\alpha$ FFFFcDNAを導入したところ、IL-7R $\alpha$ 欠損マウスでは完全に欠失する $\gamma\delta$ T細胞の分化が部分的に回復した。そこでさらにIL-7Rシグナルの詳細な解析を行うために、IL-7依存性リンパ球細胞株preBR1にキメラ受容体hIL-4R/mIL-7R-FFFFを導入し、hIL-4刺激によってJ $\gamma$ germline転写が誘導される系を確立した。その結果、IL-7R-FFFFシグナルによりSTAT5のチロシンリン酸化が誘導されること、またこのチロシンリン酸化はMEK1/2阻害剤U0126によって抑制されることが明らかになった。MEK1/2はERK1/2のスレオニン残基だけでなくチロシン残基のリン酸化酵素であることから、MEK1/2がSTAT5をチロシンリン酸化する可能性について検討したところ、MEK1によってSTAT5が直接チロシンリン酸化され、STAT5のDNA結合能も増加することが明らかになった。さらに、胎児胸腺器官培養法を用いた解析により、MEK1/2阻害剤U0126はIL-7R-FFFFシグナルによって誘導される $\gamma\delta$ T細胞の分化とV $\gamma$ -J $\gamma$ 組換えを阻害することが明らかにな

った。以上のことから、IL-7R は IL-7R $\alpha$  鎖細胞質内のチロシン残基のリン酸化を介した STAT5 活性化経路のみならず、MEK1/2 を介して STAT5 を活性化し TCR $\gamma$  遺伝子座における V-J 組換えを制御することが示唆された。（真木一茂、生田宏一）

#### （４）STAT5 によるマウス J $\gamma$ 4 プロモーターの転写活性化

マウス TCR $\gamma$  遺伝子座  $\gamma$ 4 クラスターは他のクラスターとの相同性が低いが、J $\gamma$ 4 プロモーターに STAT モチーフが保存されている。Scid.adh プレ T 細胞株や Ba/F3 造血前駆細胞株をサイトカインで刺激すると、J $\gamma$ 4-C $\gamma$ 4 germline 転写が誘導された。また、STAT5 が J $\gamma$ 4 プロモーターに結合することをゲルシフト法で確認した。さらに、Ba/F3 細胞をサイトカインで刺激すると、STAT5 が内在性の J $\gamma$ 4 プロモーターに結合することをクロマチン免疫沈降法にて確認した。最後に、STAT5 が J $\gamma$ 4 プロモーターの転写活性を上昇させることをレポーター法にて確認した。この時、STAT モチーフを破壊したコンストラクトでは転写活性が激減した。以上の結果から、STAT5 が J $\gamma$ 4 プロモーターの STAT モチーフに結合し germline 転写を誘導することが示された。また、IL-7R/STAT5 シグナルによる転写と accessibility の制御が、マウス TCR $\gamma$  遺伝子座のすべてのクラスターで当てはまることが明らかとなった。（増井尚美、谷一靖江、真木一茂、生田宏一）

#### （５）STAT5 と Runx の相互作用

STAT と Runx はリンパ球の分化で重要な働きをする転写因子である。Runx2 が STAT1 や STAT3 と結合することが報告されているが、STAT5 と Runx については知られていない。我々は、まず、STAT5 が Runx1、Runx2、Runx3 と結合することを免疫沈降実験で示した。この際に、Runx の Runt ドメインと STAT5 の DNA 結合領域と  $\alpha$  ヘリックス構造が相互作用に重要であった。CHO 細胞に発現させると、STAT5 は Runx を細胞質に留め、核移行を抑制した。また、STAT5 と Runx は相互に転写活性化能を抑制した。最後に、Ba/F3 細胞に Runx を導入すると、内在性の STAT5 標的遺伝子である CIS-1 の転写を抑制した。以上の結果から、STAT5 と Runx が結合し相互の転写活性化能を抑制し合うことが明らかとなった。（小川伸哉、生田宏一）

#### （６）ヒト癌細胞に発現しているタンパク質 U7 に対するモノクローナル抗体の作成

２次元電気泳動法によって、ヒト膀胱癌と非癌膀胱組織の構成タンパク質を比較し、膀胱癌に強く発現している新規のタンパク質を見いだした。このタンパク質を、U7 と名付けた。タンパク質の加水分解産物の分子量測定結果から、U7 タンパク質をコードする遺伝子が、C7orf24 であることが分かった。この遺伝子と 20%以上のホモロジーを持つ遺伝子は、他に存在しない。組織や細胞を用いた PCR 法によって、膀胱癌のみならず、種々の癌細胞（肺腺癌、骨肉腫、腎癌など）に発現していることが明らかになった。また、胎児組織にも発現が見られた。癌細胞における U7 タンパク質の発現を容易にするために、GST-U7 タンパク質を大腸菌に合成させ、モノクローナル抗体を 6 種類作成した。そのう



ちの3種類は SDS 変性後の U7 タンパク質にも反応し、ウエスタン法でも U7 タンパク質の検出が可能であった。（上田正道）